Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. F. Heni

Methodik und klinische Ergebnisse der Disk-Elektrophorese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Peter Gottschalk
aus Brachwitz

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0098

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. F. Heni

Methodik und klinische Ergebnisse der Disk-Elektrophorese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Peter Gottschalk
aus Brachwitz

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Dozent Dr. med. D. Klaus
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. F. Heni

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Methodik der Disk-Elektrophorese	
1. Prinzip	2
2. Durchführung der Disk-Elektrophorese	5
3. Methodische Fehler	15
C. Ergebnisse	
1. Identifizierung der bei der Disk-Elektrophorese dargestellten Banden	2o
2. Paraproteinämien	
a) Plasmocytom	22
b) Makroglobulinämie Waldenström	25
3. Dysproteinämien	
a) Lebererkrankungen	26
b) Nierenerkrankungen	28
4. Transferrin	3o
5. Haptoglobin	31
D. Besprechung der Ergebnisse	32
E. Zusammenfassung	37
F. Literaturangaben	38

A. Einleitung

Für die Auftrennung von Proteingemischen werden seit der Einführung der Makroelektrophorese durch Tiselius im Jahre 1937 eine Reihe einfacherer und weniger aufwenderiger Methoden benutzt. Zu diesen Methoden gehören die Papier-, die Immun- und die Stärkegel- Elektrophorese.

Mit der Papier-Elektrophorese lassen sich die Serumproteine in 5-6 Fraktionen auftrennen. Eine differenziertere Aussage läßt die Immun- und die Stärkegel- Elektrophorese zu, mit der 15-2o Serumproteine darstellbar sind. Der Nachteil dieser beiden Methoden besteht darin, daß eine quantitative Erfassung der dargestellten Banden bisher nicht möglich ist.

Im Jahre 1959 wurde von Davis und Ornstein (6) die Disk-Elektrophorese beschrieben, bei der als Trägersubstanz das Polyacrylamid verwandt wird.

Wir stellten uns die Frage, inwieweit mit dieser Methode, mit der die Serumproteine in 15-2o Banden aufgetrennt werden, für die klinische Diagnostik neue zusätzliche Ergebnisse gewonnen werden können, die über die mit der Papier-Elektrophorese gewonnenen Erkenntnisse hinausgehen, und ob mit dieser Methode auch eine quantitative Analyse möglich ist.

B. Methodik der Disk-Elektrophorese

1. Prinzip

Das Trennvermögen der disk-elektrophoretischen Methode beruht auf dem Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidgels und der elektrischen Beweglichkeit der Proteinmoleküle im Polyacrylamidgel. Die Trägersubstanz der Disk-Elektrophorese ist das Polyacrylamidgel. Es ist ein Polymerisationsprodukt von Acrylsäureamid ($CH_2 = CH - CO - NH_2$) mit einem Vernetzer, meist N,N'- Methylenbisacrylamid ($CH_2 = CH - CO - NH - CH_2 - NH - CO - CH = CH_2$). Das Maschenwerk des Polyacrylamidgels ist dreidimensional und entsteht durch Vernetzung nebeneinander wachsender Polyacrylamidketten, die nach Art der Vinylpolymerisation entstehen (Mischpolymerisation). Als Brückenglied zwischen einzelnen Polyacrylamidketten dient das N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis-Ac). Der Vernetzungsgrad, d.h. die Menge des eingebauten Vernetzers Bis-Ac und der Polymerisationsgrad (Kettenlänge) des Polyacrylamids bestimmen die Elastizität und die Festigkeit des Gels. Eine große Rolle spielen bei der Herstellung von Gelen die Gewichtsverhältnisse zwischen Acrylamid (Ac) und Bis-Ac. Liegt das mengenmäßige Verhältnis von Ac zu Bis-Ac unter 1o:1, so werden die Gele starr, trübe und brüchig; ist es größer als 1oo:1, so sind die Gele pappig und zerfallen leicht. Völlig transparente und elastische Gele erhält man bei einem Verhältnis von 3o:1 (Mengenangaben von Ac und Bis-Ac siehe S. 5).

Die Dichte des Gelgitterwerks kann man als durchschnittliche Porengröße ausdrücken. Über die Änderung der Porengröße findet man in der Literatur unterschiedliche Angaben. Nach Maurer (11) wird die Porengröße durch das Ac und das Bis-Ac bestimmt, Ornstein und Raymond (12,17) nehmen dagegen an, daß man nur durch Ac-Änderungen eine unterschiedliche Weite der Poren erzielt und das Bis-Ac dem Gel lediglich mechanische Stabilität verleiht.Der Porendurchmesser hat seine Bedeutung bei der Trennung von Molekülen verschiedener Größe und Gestalt nach dem Molekularsiebeffekt, d.h. die Moleküle, die das Gel durchwandern, lassen sich nicht nur nach ihrer Ladung auftrennen, sondern werden infolge ihrer unterschiedlichen Molekülgröße und Molekülgestalt ausgesiebt. So weist ein 7,5%iges Polyacrylamidgel eine durchschnittliche Porenweite von 5o Å und ein 3o%iges Gel einen Durchmesser der Poren von 2o Å auf. Wir verwendeten zur Herstellung eines großporigen Gels eine 2,5%ige und für ein mittelporiges Gel eine 7,o%ige Ac-Lösung.Diese Ac-Konzentrationen ergaben unter Berücksichtigung des richtigen Gewichtsverhältnisses zum Bis-Ac elastische und transparente Gele, die speziell zur Trennung von Serumproteinen geeignet waren.

Zur Mischpolymerisation von Polyacrylamidgelen verwendet man bei der Disk-Elektrophorese zwei Katalysator-Redoxsysteme; das Ammoniumpersulfat-N,N,N',N'-Tetramethylendiamin und das Riboflavin-N,N,N',N'-Tetramethylendiamin.N,N,N',N'-

Tetramethylendiamin (Temed) ist ein tertiäres aliphatisches Amin, das die Mischpolymerisation der von uns verwendeten 2,5- und 7,o%igen Acrylamidlösungen beschleunigt.Zusätzlich benutzt man noch zwei Katalysatoren, für die Herstellung des Trenngels das Ammoniumpersulfat und für die des Schichtgels das Riboflavin (s.S.6). Bei Ammoniumpersulfatanwesenheit läuft die Polymerisation nur bei Dunkelheit ab,während das Riboflavin (Photokatalysator) erst bei starker Sonnenlichtbestrahlung oder durch Einwirkung einer Tageslichtfluoreszenzlampe die Polymerisation katalysiert.Nach den Untersuchungen von Davis (5) besitzen Riboflavin-katalysierte Gele im Vergleich zu Ammoniumpersulfat-katalysierten Gelen größere Poren. Das Riboflavin benötigt man deshalb zur Herstellung großporiger Gele, den Ammoniumpersulfatkatalysator zur Herstellung kleinporigerer Gele.

Aus dem Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidgels und der elektrischen Beweglichkeit der Proteinmoleküle im Polyacrylamidgel erwachsen mehrere Vorteile gegenüber der herkömmlichen Papier-Elektrophorese: der geringere Materialverbrauch, die kurzen Trennzeiten (3o-4o Minuten), das hohe Auflösungsvermögen für Moleküle verschiedenster Größe und die gute Reproduzierbarkeit der Proteintrennungen.

2. Durchführung der Disk-Elektrophorese

a) Für die Disk-Elektrophorese sind folgende Substanzen und Lösungen erforderlich :

1. Acrylamid (Ac)
2. N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis-Ac)
3. 2-Amino-2-Hydroxymethyl-1-3-Propandiol (Tris)
4. 1n HCl
5. Ammoniumpersulfatkatalysator (o,14%ig)
6. Riboflavinkatalysator (4%ig ; maximal 8 Tage haltbar)
7. Glycin
8. Saccharose (4o%ig ; maximal 8 Tage haltbar)
9. Anilin-Blauschwarz (7%ig)
10. Essigsäure (7%ig)
11. Bromphenolblau (o,oo5%ig)
12. 3n Kalilauge
13. ß-Alanin
14. Tris-Glycin-Puffer (pH 8,4)
    Tris : 3,0g
    Glycin:14,4g
    Aqua dest. ad 1 Liter
15. Tris-Temed-Puffer (pH 8,9)
    Tris :36,3g
    1n HCl :48ml
    Temed :o,23ml
    Aqua dest. ad 1oo ml
16. Tris-Temed-Puffer (pH 6,7)
    Tris : 5,98g
    1n HCl :48ml
    Temed :o,46ml
    Aqua dest. ad 1ooml
17. Standardgel A
    Acrylamid :28,0g
    Bis-Ac :o,735g
    Aqua dest. ad 1ooml
18. Standardgel B
    Acrylamid :1o,0g
    Bis-Ac : 2,5g
    Aqua dest. ad 1ooml

b) Für die Auftrennung von Serumproteinen bei der Disk-Elektrophorese benötigt man zwei verschiedene Polyacrylamidgele; ein großporiges Schichtgel, in dem die Proteinmoleküle des Serums durch Polymerisation eingebettet und bei Beginn der Elektrophorese konzentriert werden und ein kleinporiges Trenngel, in dem die Proteinmoleküle infolge ihrer unterschiedlichen Ladung getrennt werden. Das Schicht- und das Trenngel haben folgende Zusammensetzung:

aa) Schichtgel
2ml Tris-Temed-Puffer (pH 6,7)
4ml Standardgel B
2ml Riboflavin
8ml Saccharose

bb) 3ml Tris-Temed-Puffer (pH 8,9)
6ml Standardgel A
3ml Aqua dest.
12 ml Ammoniumpersulfat

cc) Die zusätzlich verwendete Kontaktflüssigkeit , die ebenfalls bei Lichteinstrahlung polymerisiert, dient dem nahtlosen Zusammenfügen der aneinandergrenzenden Flächen von Schicht- und Trenn-Gel.Sie setzt sich folgendermaßen zusammen:

Kontaktflüssigkeit
1ml Tris-Temed-Puffer (pH 6,7)
2ml Standardgel A
1ml Aqua dest.

dd) Die Haltbarkeit der Lösungen ist zeitlich nicht unbegrenzt.Es empfiehlt sich, alle Lösungen, außer Ammoniumpersulfat,bei + 4°C in einem Kühlschrank aufzubewahren. Das Ammoniumpersulfat muß, vor Feuchtigkeit geschützt, in einem Exsikkator aufbewahrt werden. Bei beiden Tris-Temed-Puffern ist streng auf genaue Einstellung des pH-Wertes zu achten. Riboflavin und Saccharose sind maximal 8 Tage haltbar. Der Tris-Glycin-Puffer kann 6-7 mal benutzt werden.

c) Apparatur

Zur Durchführung der Disk-Elektrophorese haben wir die von der Firma Canalco (Canal Industrial Corporation, 5635 Fisher Lane; Rockville, Maryland 2o852 U.S.A.) hergestellte Apparatur (Modell 12) verwandt, die in Deutschland durch die Firma Kurt Hillerkus, 415o Krefeld, Uerdinger Str. 463, vertrieben wird. In der Abb. 1 sind die Apparatur und die Zubehörteile dargestellt:

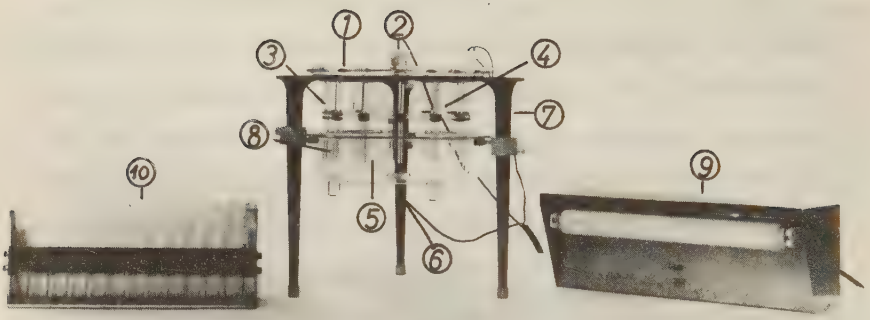
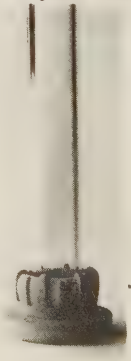


Abb. 1 Disk-Elektrophorese - Apparatur und Zubehör

1. Baddeckel
2. Obere Elektrode (Kathode)
3. Badstopfen
4. Oberes Bad
5. Unteres Bad
6. Untere Elektrode (Anode)
7. Elektrophoresegestell
8. Elektrophoreseröhrchen
9. Tagesfluorescenzlampe
10. Polymerisationsgestell

---Standkappen

Abb. 2 Elektrophorese-röhrchen



--Standkappen

Abb. 3 Entfärberöhrchen

d) Praktische Durchführung

aa) Für die Disk-Elektrophorese benötigt man zwei verschiedene Gellösungen, die, in drei Schichten nacheinander polymerisiert, ein festes Gel ergeben. Wir arbeiteten mit einem kleinporigen Trenngel und einem großporigen Schichtgel. Aus dem letzteren werden wiederum zwei Gele, ein Substanzgel und ein Sammelgel, hergestellt, wobei beide Anteile die gleiche chemische Zusammensetzung besitzen, aber beim Sammelgel infolge kürzerer Polymerisationszeit eine kleinere Porenweite als beim Substanzgel besteht. Diese drei Schichten werden durch die Kontaktflüssigkeit zusammengekittet. Die Funktion dieser drei Gele ist folgendermaßen zu beschreiben:

1. Substanzgel (großporiges Schichtgel): in ihm wird eine bestimmte Serumproteinmenge (Substanz) bei der Polymerisation eingebettet.

2. Sammelgel (mittelporiges Schichtgel, infolge kürzerer Polymerisationsdauer als das Substanzgel): hier werden die Serumproteine nach ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit angeordnet.

3. Kleinporiges Trenngel: während der Elektrophorese erfolgt hier die Trennung der Serumproteine.

bb) Vor Beginn der Disk-Elektrophorese müssen alle Lösungen auf Zimmertemperatur angenähert werden. Schicht- und Trenngel werden frisch hergestellt. Die Schichtgellösung muß in einem schwarz angestrichenen Erlenmeyerkolben aufbewahrt werden, um den im Schichtgel enthaltenen Photokatalysator

Riboflavin-Temed vor Lichteinfall zu schützen.
Mit einer Mikropipette pipettiert man in jede der 12 Standkappen 3µl des zu untersuchenden Serums, füllt die Standkappen mit je o,2 ml Substanzgel und mischt beide Anteile mit einer Mikropipette oder einem feinen Glasstab. In jede Standkappe wird jetzt ein zylindrisches Elektrophoreseröhrchen (s. Abb. 2) gedrückt, so daß die Substanzgellösung in das Elektrophoreseröhrchen hochsteigt. Darüber wird etwa o,1 ml Wasser geschichtet. Man achte besonders darauf, das Wasser nicht unter die Gellösung zu schichten. Wir verwendeten zu diesem Zweck eine Tuberkulinspritze, auf deren Nadelspitze wir einen langen Polyäthylenschlauch schoben. Nur so war es möglich, das Wasser auch tatsächlich über die Substanzgellösung zu schichten. Nach dem Überschichten mit Wasser stellt man sämtliche Elektrophoreseröhrchen mit den Standkappen in ein Polymerisationsgestell (Abb.1, Nr.1o) und läßt die Substanzgellösungen dicht vor einer Tageslichtfluoreszenzlampe Abb.1, Nr.9) polymerisieren.Aus den flüssigen Gellösungen entsteht nun durch photokatalysierte Polymerisation das feste Gel. Ungefähr 6-1o Minuten nach Beginn der Belichtung mit der Tageslichtfluoreszenzlampe beobachtet man eine opalisierende Trübung des Substanzgels als Zeichen der beginnenden Photopolymerisation. Nach Ablauf dieser Zeit dreht man das Polymerisationsgestell so um, daß das zum Gelüberschichten verwendete Wasser aus den Elektrophoreseröhrchen rinnen kann. Zurückbleibende Wasser-

reste müssen gelegentlich mit einer Spritze abgesaugt werden, wobei man darauf achten muß, daß nicht das Gel herausgesaugt wird. Nun spült man zweimal die Geloberfläche mit der Kontaktflüssigkeit (s.S.6), wobei jeweils das Gel 1 cm hoch mit dieser Flüssigkeit überschichtet wird. Mit der Kontaktflüssigkeit kann man noch geringe Wassermengen entfernen. Erneutes Absaugen der Kontaktflüssigkeit ist notwendig, falls sie beim Drehen der Röhrchen nicht von allein herausrinnt. Anschließend werden o,15ml Sammelgel in jedes Elektrophoreseröhrchen so eingefüllt, daß die Sammelgelflüssigkeit an der Elektrophoreseröhrcheninnenwand herunterrinnt und so eine blasenfreie Überschichtung des Substanzgels gewährleistet ist. Die Sammelgelflüssigkeit wird ebenfalls jeweils mit o,1 ml Wasser überschichtet und in einem Abstand von 3o cm vor der Lichtquelle 15 Minuten, weitere 15 Minuten dicht vor der Lichtquelle photopolymerisiert. Aus der Sammelgelflüssigkeit entsteht ein festes Sammelgel. Erst dann werden nach Entfernen der Wasserschicht alle Elektrophoreseröhrchen mit Trenngelflüssigkeit aufgefüllt. Zuvor benutzt man aber einen Teil der Trennflüssigkeit, um Wasserreste herauszuspülen. Alle Röhrchen werden mit Stanniolpapier abgedeckt. Unter Lichtschutz muß jetzt während 3o Minuten die Trenngelflüssigkeit zum festen Trenngel polymerisieren. Diese Polymerisation muß spätestens 1o'nach Herstellung der Trenngelflüssigkeit erfolgen, da sonst der Katalysator Ammoniumpersulfat durch das Tageslicht unwirksam gemacht wird. Nach Ablauf der Polymerisation löst man die Stanniolversiegelung

vorsichtig über eine Ecke ab, so daß keine Luftblasen in das Trenngel eintreten. Genauso vorsichtig löst man die Bodenkappen von den Elektrophoreseröhrchen ab.

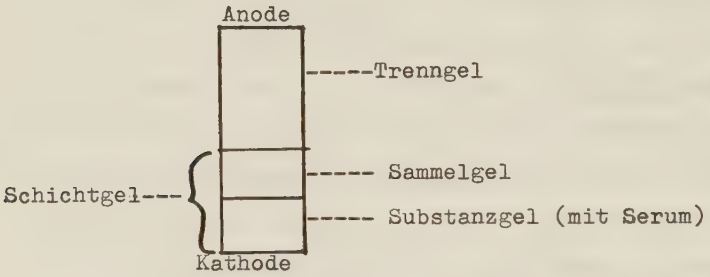


Abb.4 Gelschichtung bei der Disk-Elektrophorese

Nun füllt man das obere und untere Bad jeweils mit 1 Liter Tris-Glycin-Puffer, nachdem man die 12 Löcher des oberen Bades mit den Badstopfen (s.Abb.1) verschlossen hat. Dem Puffer im oberen Bad gibt man 5ml einer o,oo5%igen Bromphenolblaulösung hinzu. Das Elektrophoreseröhrchen wird auf der Seite des Substanzgel - Serums (s.Abb.4) mit Tris-Glycin-Puffer angefeuchtet und unter leichtem Hebeln von unten, unter gleichzeitiger Entfernung der Badstopfen, in die Gummistopfen gedrückt. Die Elektrophoreseröhrchen sollen möglichst senkrecht in die untere Pufferlösung eintauchen. Bevor man das untere Bad so anhebt, daß die Elektrophoreseröhrchen etwa 1 cm in die Pufferlösung hineinragen, setzt man mit einer Spritze unter jedes Röhrchen einen Tropfen Puffer, um eventuell entstehende Luftblasen zu vermeiden. Beide Elektroden, die in die Pufferlösung eintauchen müssen,

werden nun an das Stromversorgungsgerät geschlossen und die Elektrophorese kann beginnen.

cc) Elektrophorese

Die erforderliche Stromstärke richtet sich nach der Zahl der verwandten Elektrophoreseröhrchen und muß 5 mA pro Röhrchen betragen. Die Elektrophoresedauer betragt 55 Minuten. Während dieser Zeit muß das Wandern des Bromphenolblaus beobachtet werden, das im elektrischen Feld dem am schnellsten wandernden Protein Präalbumin unmittelbar vorausgeht. Nach Beendigung der Elektrophorese drückt man mit Hilfe der Badstopfen die Elektrophoreseröhrchen vorsichtig heraus und gießt den Tris-Glycin-Puffer aus dem oberen und unteren Bad ab. Um die Gelsäule aus den Elektrophoreseröhrchen zu entfernen, umsticht man das Gel mit einer Nadel 2 cm tief an dem Kathodenende (s.Abb.4), in dem zu Beginn der Elektrophorese die Serumproteine eingebettet wurden. Am anderen Ende wird durch Einspritzen von Wasser das Gel von der Elektrophoreseröhrcheninnenwand gelöst. Zu starker Spritzdruck bewirkt oft ein Zerreißen der Gele. Wir verwendeten deshalb einen Glasstab, dessen Durchmesser gerade die Röhrchenlichtung ausfüllte und mit dem man das Gel in ein Reagenzglas drücken kann, in das zuvor Farblösung (Anilin-Blauschwarz) gefüllt wurde.

dd) Färbung und Entfärbung

Die Serumproteine werden nach ihrer Trennung 1 Stunde lang mit Anilin-Blauschwarz gefärbt. Die überschüssige Farbe wird abgegossen und anschließend erfolgt das Spülen der

gefärbten Proteigele mit 7%iger Essigsäure. Die Entfernung des Farbstoffes, der nicht an die Proteine gebunden wurde, gelingt dann sehr elegant durch elektrophoretische Wanderung des Farbstoffes. Dazu werden die Entfärberöhrchen (s.Abb.3), die einen größeren Durchmesser aufweisen und länger als die Elektrophoreseröhrchen sind, in die entsprechenden Bodenkappen gesetzt. Die leeren Entfärberöhrchen stellt man in das Polymerisationsgestell, füllt in jedes o,5 ml Schichtgellösung und läßt die Gellösung etwa 4o Minuten dicht vor der Lichtquelle polymerisieren. Die Gele können jetzt in die so abgedichteten Entfärberöhrchen umgeschüttet werden und nach Auffüllen der Entfärberöhrchen mit 7%iger Essigsäure genau wie die Elektrophoreseröhrchen in die Gummistopfen des oberen Bades gedrückt werden.In das obere und untere Bad bringt man jeweils 1 Liter 7%ige Essigsäure und schraubt das untere Bad so hoch, daß die Entfärberöhrchen etwa 1 cm in das untere Bad eintauchen. Die Entfärbezeit beträgt 45-6o Minuten und die Stromstärke 12,5 mA pro eingesetztes Röhrchen.

ee) Aufbewahrung

Aufbewahrt werden die Gele in Reagenzgläsern, die mit 7%iger Essigsäure aufgefüllt und in einem kühlen Raum gelagert werden. Zur Reinigung der Bodenkappen und der Röhrchen bewährt sich 3n Kalilauge, die gründlicher als Chromschwefelsäure eventuelle Gelrückstände von der Röhrcheninnenwand entfernt. Die gereinigten Röhrchen werden für einige Minuten in ein Gefäß mit silikonhaltiger Benetzungssubstanz gestellt und in einem Wärmeschrank getrocknet.

3. Methodische Fehler

a) Verwendung von alten und unsauber aufbewahrten Seren

Es empfiehlt sich, immer frische Seren zu verwenden (5) oder das Serum bei Temperaturen von -15°C einzufrieren. Bei Verwendung bakteriell verunreinigter, alter, unsauberer oder nicht verschlossener Seren ist die Eiweißtrennung ungenügend, d.h. die Proteinbanden sind bei der Trennung unscharf begrenzt.

b) Ungenügende Benetzbarkeit der benutzten Röhrchen

Bei ungenügender Benetzbarkeit der Elektrophoreseröhrchen sind zwei Fehlerquellen möglich, einmal ist die Überschichtung mit Aqua dest. schwierig, zum anderen bedingen nicht beseitigte Gelreste oft Farbschlieren. Ganz besondere Schwierigkeiten ergeben sich, wenn beim Überschichten des Gels Wasser unter die Schichtgellösung gelangt. Dann verändert sich die Konzentration der Gellösung durch die Mischung mit Wasser, was ebenfalls eine Verzerrung der Proteinbanden bedingt. Eine sachgemäße Reinigung der Elektrophoreseröhrchen mit 3n Kalilauge ist deshalb unumgänglich, da sie die Voraussetzung für eine gute homogene Benetzbarkeit mit silikonhaltiger Flüssigkeit ist.

c) Falsche Mischung von Serum und Gel

Die besten Trennungen der Serumproteine werden bei Einsatz von 2 µl Serum erzielt. Allerdings sind bei Einsatz dieser Menge Spurenproteine nicht darstellbar. So sind beispielsweise die feinen Banden der Haptoglobine vom Hp. 2-1 und Hp. 2-2-Typ im Gammaglobulinbereich nicht zu erkennen. Ver-

wendet man aber 5 µl Serum, so kommen zwar diese Banden zur Darstellung, doch sind sie oft nicht von den ß- und γ-Globulinen abzugrenzen. Lediglich durch eine längere Elektrophoresezeit könnte man die Bandenauftrennung bei Einsatz von 5 µl Serum verbessern, dies ist aber durch die Röhrchenlänge begrenzt. Als Kompromiß verwendeten wir eine Serummenge von 3 µl, womit auch feine Banden darstellbar sind und die Auftrennung gut ist, wenn auch nicht so optimal wie bei 2 µl Serum.

d) Fehler bei oder durch die Elektrophorese selbst

aa) Laufzeit

Bei der Disk-Elektrophorese überlagern sich infolge ihrer nur geringfügigen unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit eine ganze Anzahl von Banden. Dieser Nachteil wirkt sich besonders kritisch bei der Bandenauftrennung im Bereich der langsam wandernden, hochmolekularen Proteine aus. Eine bessere Trennung dieser Fraktionen ist nur möglich, wenn man großporige Gele (17) benutzt und die Elektrophoreselaufzeit erhöht, was allerdings bei gegebener Röhrchenlänge von 5 cm auf Kosten der Trennung im Bereich der schnell wandernden Fraktionen geht.

bb) Die Temperatur im Innern der Gele darf 40°C nicht übersteigen, da sonst die Proteine koaguliert werden und die Wanderung der Proteinmoleküle unmöglich wird. Besonders temperaturempfindlich sind die Paraproteine bei Myelomseren. Deshalb ist streng darauf zu achten, daß jedes Elektrophoreseröhrchen nur mit 5 mA belastet wird.

cc) Während der Elektrophorese findet gleichzeitig eine Diffusion statt, die von der Viskosität der Gele, von der Temperatur, der Durchlaufzeit und der Molekülgröße abhängig ist. Die Diffusion betrifft nur die schnell wandernden Proteine, deren anodische Wanderung durch die Porengröße nicht eingeschränkt wird. Daraus resultiert eine geringe Unschärfe dieser schnell wandernden Banden.

dd) Bei Erschütterungen des Badgestells während der Elektrophorese kann es zu ungewünschten Bandenverzerrungen kommen. Auch müssen die Elektrophoreseröhrchen vor Beginn der Elektrophorese senkrecht in das untere Pufferbad eingelassen werden, da sonst ebenfalls verzerrte Proteinfraktionen entstehen.

e) Fehler beim Färben und Entfärben

aa) Bei vorzeitiger Unterbrechung des Färbens kommt es zu einer ungenügenden Fixierung der Proteine. Beim nachfolgenden Entfärben können dann die Proteine erneut wandern, weil ja die Entfärbung durch elektrische Wanderung erfolgt. Da das Gel von Farbe umgeben ist und die Fixierung von außen nach innen geht, und damit die zentralen Bandenanteile später fixiert werden, wandern dann hauptsächlich die Proteinmoleküle in der nicht genügend fixierten Mitte der Bande. Man beobachtet nun, daß die Begrenzung der Bande nach außen hin scharf ist, während die Begrenzungslinien der Proteinbande in der Mitte des Gels unscharf sind. Dieser Fehler läßt sich selbst durch eine längere Färbezeit nicht immer vermeiden.

bb) Das für die Färbung verwendete Anilin-Blauschwarz färbt alle Proteine gut an. Da es nicht irreversibel an die Proteine gebunden ist, kann die Farbe bei zu langem Entfärben teilweise wieder aus den Proteinen herausgelöst werden. Besonders bei gering konzentrierten Proteinfraktionen kann dieser Entfärbevorgang zur Auslöschung der entsprechenden Banden führen. Der Entfärbevorgang muß deshalb auf 1 Stunde begrenzt werden.

4. Quantitative Auswertung der Proteinfraktionen

Die quantitative Erfassung der mit der Disk-Elektrophorese getrennten Proteinfraktionen bereitet vorläufig noch große Schwierigkeiten.

Abb.5 Quantitative Auswertung von Proteinfraktionen eines normalen Serums; ⊖=Kathode (Auftragsstelle) ⊕=Anode, Erklärung s. Text

Nimmt man die Auswertung der erhaltenen Proteinbanden (Abb.5) mit dem Flächenintegrator "Cromoscan" (Hersteller: Fa. Loebl & Co, Gateshead, England) vor, so muß die Empfindlichkeit des Gerätes so eingestellt werden, daß das Albumin vollständig erfaßt wird (Abb.5,li. Bild).Die kleinen schwachen Proteinfraktionen kommen dann aber nicht zur Darstellung (insgesamt nur 14 Banden). Steigert man die Empfindlichkeit des Gerätes, so daß auch die schwachen Banden als abgesetzte Kurven erfaßt werden (22 Banden), dann kann die Albuminfraktion nicht quantitativ ausgewertet werden (Abb.5,re. Bild). Selbst bei Erfassung aller Proteinbanden ist die Trennung der Banden mit dem Integrator im Posttransferrinbereich unbefriedigend, da die γ-Globuline unmittelbar nach dem Startpunkt (Kathode) bei der Disk-Elektrophorese ungenügend getrennt werden und sich in diesem Bereich noch die hochmolekularen Proteine der α_2-und ß-Globulinfraktion finden. Bisher ist nur eine semiquantitative Auswertung durch optischen Vergleich möglich, womit natürlich nur sehr grobe Veränderungen der Proteinbanden erfaßt werden können.

C. Ergebnisse

1. Identifizierung der bei der Disk-Elektrophorese des Serums dargestellten Banden

Eine Zuordnung der Proteinbanden ist bei der disk-elektrophoretischen Trennung von Humanseren bisher nur für einzelne Fraktionen gelungen. Mit Sicherheit können das Präalbumin, das Albumin, das Transferrin und das α_2-Makroglobulin identifiziert werden (s.Abb.6). Die dazwischenliegenden Proteinbanden werden summarisch als Postalbumin- und Posttransferrin-Fraktion bezeichnet. Im Postalbuminbereich befinden sich die α_1-Globuline und unmittelbar vor dem Transferrin eine Haptoglobinfraktion (Hp.1). Der Posttransferrinbereich enthält die α_2-, ß- und die γ-Globuline. Im Normalserum finden sich in diesem Bereich meistens 6 weitere Haptoglobinbanden (Hp.2), das α_2-Makroglobulin und das ß-Makroglobulin (IgM) (5,14,16,17,24). Eine weitere Aufschlüsselung der Proteinbanden ist nur mit vergleichender Analyse reiner Proteinfraktionen und speziellen Färbemethoden möglich, wie beispielsweise Sudanrot für die ß-Lipoproteide oder Fuchsin für die kohlehydrathaltigen α_1- und α_2-Globuline.

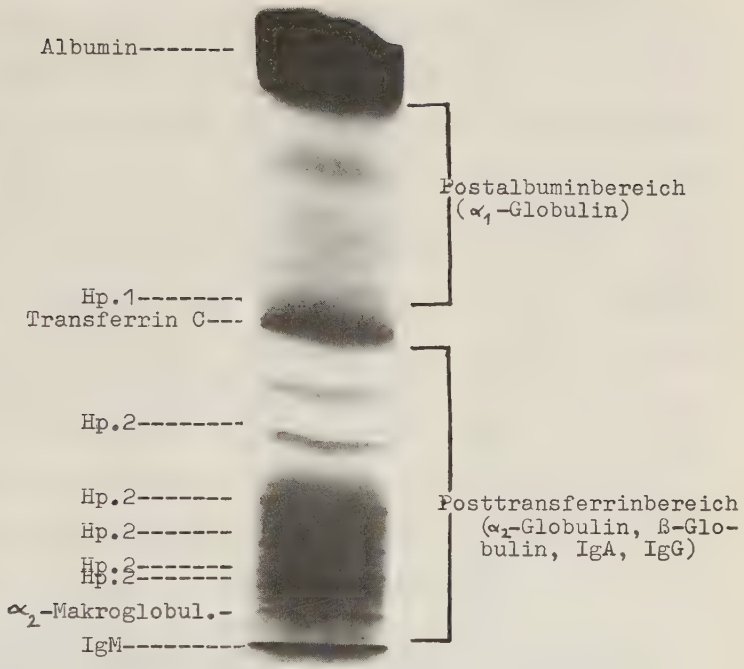


Abb. 6 Bandenverteilung im normalen Serum mit der Disk-Elektrophorese (Hp.= Haptoglobin)

2. Paraproteinämien

a) Plasmocytom

Bei den Plasmocytomen handelt es sich um eine"neoplastische monoklonale Immunoglobulie" mit zwei charakteristischen Krankheitsmerkmalen: der neoplastischen Zellwucherung atypischer Plasmazellen und der Paraproteinbildung in diesen atypischen Plasmazellen. Das Paraprotein stellt bei der Papier-Elektrophorese eine homogene, quantitativ stark vermehrte Fraktion eines strukturell abgewandelten Immunglobulins dar, das sich bei der Stärkegel- und auch bei der Disk-Elektrophorese als heterogen erwies (18,2o,23,24). Nach immun-elektrophoretischen Untersuchungen können 3 Paraproteine unterschieden werden: IgA, IgG und IgM. Bei den Plasmocytomen handelt es sich um IgA- oder um IgG-Paraproteine. Das IgA-Paraprotein unterscheidet sich von dem IgG-Paraprotein nicht nur durch seine Beweglichkeit im elektrischen Feld und durch seine Antigenstruktur, sondern auch dadurch, daß es neben der Hauptkomponente, die eine Sedimentationsgeschwindigkeit von 6-7S besitzt, noch höhermolekulare Anteile enthält. Diese höhermolekularen Anteile (Nebenkomponenten) weisen Sedimentationskonstanten zwischen 7 und 19S auf. Dabei ist die Anzahl der Nebenkomponenten nicht konstant, sondern variiert von Fall zu Fall. Auch haben die Nebenkomponenten eine geringere Paraproteinkonzentration als die Hauptkomponenten. Diese Heterogenität wird teilweise erst

nach Zusatz von dissoziierenden SH-Reagenzien (Cysteamin und Sulfhydril) elektrophoretisch darstellbar (18,19,23). Nach Zingale et al. (23) stellten sich bei der Disk-Elektrophorese auch ohne Zusatz dissoziierender SH-Reagenzien Nebenkomponenten dar. Die Autoren führen diesen Befund darauf zurück, daß die Polymertypen eines Paraproteins bei der Disk-Elektrophorese offenbar eher durch Differenzen in der Molekülgröße als durch die unterschiedliche Ladung getrennt werden. In jedem Falle einer Paraproteinämie findet man aber eine stark konzentrierte Hauptkomponente, während die Nebenkomponenten vorhanden sein können oder erst durch dissoziierende SH-Reagenzien darstellbar sind.

aa) Wir haben 6 Myelomseren vom IgA-Typ untersucht, die in der Papier-Elektrophorese einen schmalbasigen M-Gradienten aufwiesen (s.Abb.7).

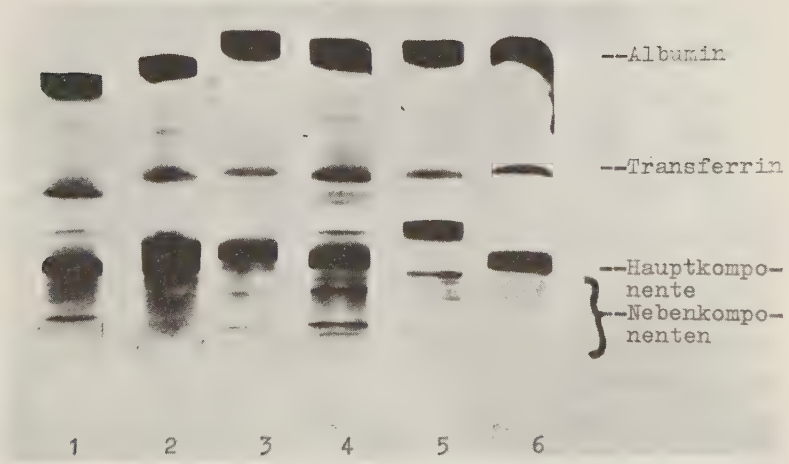


Abb.7 Disk-Elektrophorese bei 6 Patienten mit IgA-Plasmocytom

Dabei fanden sich bei 2 Patienten nur eine Hauptkomponente (Fall1,6), bei den anderen 4 Fällen Nebenkomponenten (Fall 2,3,4,5). Die anderen Proteinfraktionen zeigen folgende Veränderungen: Verminderung der α_1-Globuline in den Fällen 3,5 und 6, Verminderung der Haptoglobine (2,3,5 und 6) und des Transferrins (3,5 und 6).

bb) In der Abb.8 sind die disc-elektrophoretischen Veränderungen von 5 IgG-Plasmocytomseren dargestellt. Papier-elektrophoretisch konnte bei allen 5 Seren ein schmalbasiger M-Gradient festgestellt werden. Die Immun-Elektrophorese bestätigte das Vorliegen eines IgG-Plasmocytoms mit einer atypischen Präcipitationslinie gegen γ-Globulin.

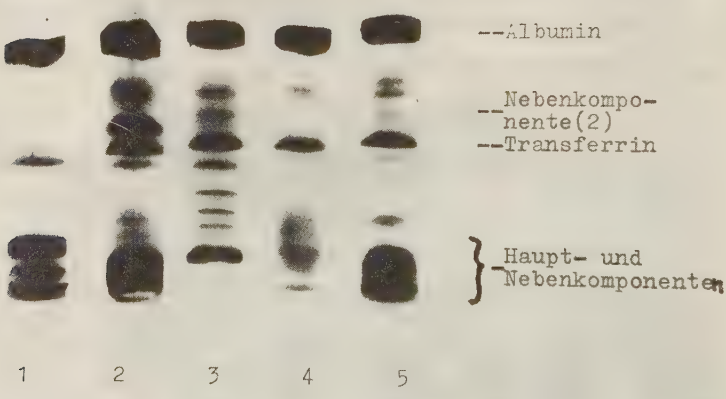


Abb.8 Disk-Elektrophorese bei 5 Patienten mit IgG-Plasmocytom

Die Wanderungsgeschwindigkeit und die Auftrennung der IgG-Paraproteine in Haupt- und Nebenkomponenten ist, wie Abb.8

zeigt, im Gegensatz zu den IgA-Paraproteinen sehr unterschiedlich. In allen 5 Fällen liegen die Hauptkomponenten im Posttransferrinbereich. In 3 von 5 Fällen (1,2 und 5) finden sich zusätzliche Paraproteinnebenkomponenten; jeweils 2 im Posttransferrinbereich (Fälle 1 und 5) und 1 Nebenkomponente im Postalbuminbereich (Fall 2). Was die Veränderungen der anderen Proteinfraktionen anbelangt, so erkennen wir eine Verminderung des Transferrins und der α_1-Globuline bei nur einem Patientenserum (Fall 1) und der Haptoglobine in den Fällen 1,2,4 und 5.

b) Makroglobulinämie Waldenström

Wie Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge zeigen, sind auch die Paramakroglobuline nicht homogen, sondern heterogen (21,23), da sich hierbei die Makroglobuline in 2-5 Einzelkomponenten auftrennen. Von Deutsch und Morton (3) wurde nachgewiesen, daß die Paramakroglobuline nach Zusatz von SH-Reagenzien in kleinere Einheiten von 6-7S dissoziieren. Auch mittels der Disk-Elektrophorese konnten mehrere Nebenkomponenten ohne Zusatz dissoziierender SH-Reagenzien dargestellt werden (23). Die Abb.9 zeigt die Auftrennung der Seren von 4 Patienten mit Makroglobulinämie Waldenström, die alle durch den immun-elektrophoretischen Nachweis eines Paramakroglobulins gesichert waren.

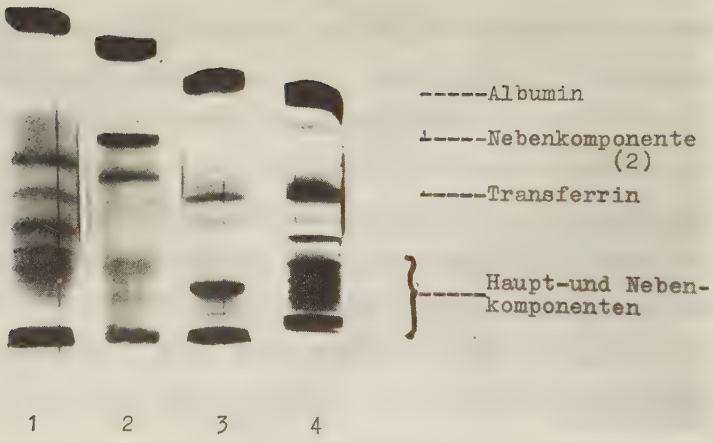


Abb.9 Disk-Elektrophorese bei 4 Patienten mit Makroglobulinämie Waldenström

In allen Fällen findet sich die Hauptkomponente des Paramakroglobulins nahe der Auftragsstelle. Entsprechend dem hohen Molekulargewicht wandern Makroglobuline nur langsam im elektrischen Feld. Daneben findet man aber im Fall 2 eine schnellwandernde Nebenkomponente im Postalbuminbereich, eine Makroglobulinkomponente im Posttransferrinbereich (Fall 3) und mehrere Nebenkomponenten im Fall 4. Von den anderen Proteinfraktionen sind das Haptoglobin und das Transferrin in den Fällen 1,2 und 3 und die α_1-Globuline in den Fällen 1,2,3 und 4 vermindert.

3. Dysproteinämien

a) Lebererkrankungen

Während die papier-elektrophoretische Auftrennung der Serumproteine bei den untersuchten Patienten mit Lebercirrhose

keine Unterschiede erkennen läßt (bei allen Patienten findet sich eine deutliche Vermehrung der γ-Globuline), ergibt die Auftrennung mittels der Disk-Elektrophorese sehr unterschiedliche Verhältnisse. Die Abb.1o zeigt die Seren von 3 Patienten mit einer Lebercirrhose (Fall 1,2 und 3) im Vergleich zu einem Normalserum.

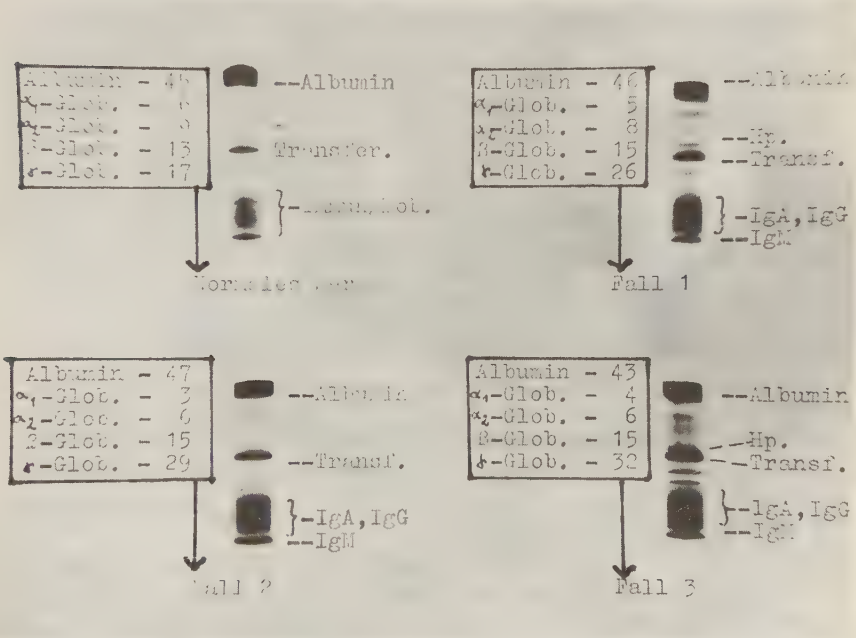


Abb.1o Disk-Elektrophorese bei drei Patienten mit Leber-Cirrhosen (In den umrahmten Kästchen die Werte der zugehörigen Papier-Elektrophorese in rel.%)

Bei dem ersten Patienten, bei dem histologisch eine Fettleber mit beginnendem cirrhotischen Umbau vorliegt (Bromsulfhalein-Test mit 7%), sind die Immunglobulinkomponenten IgA und IgG vermehrt. Beim zweiten Patienten fällt besonders

die deutliche Vermehrung der Immunglobulinkomponente IgM auf. Das Transferrin und die α_1-Globuline sind bei diesen beiden Patienten unauffällig. Bei dem dritten Patienten, bei dem eine ausgesprochene Lebercirrhose besteht (Bromsulfhalein-Test mit 28,3%), sind die Immunglobulinkomponenten IgA und IgG stark, IgM nur gering vermehrt. Auch das Transferrin ist leicht vermehrt. Die ß-Globuline sind nicht zu beurteilen, da sie von den γ-Globulinen verdeckt werden. Die α_1-Globuline sind unauffällig.

b) Nierenerkrankungen

In der Abb. 11 sind 3 Patientenseren mit nephrotischem Syndrom (Fall 1,2 und 3) und ein Normalserum dargestellt. Bei allen 3 Patienten bestand das typische Bild des nephrotischen Syndroms bei chronischer Nephritis-Nephrose mit Proteinurie und Hypoproteinämie. In der Papier-Elektrophorese fällt die deutliche Vermehrung der α_2-Globuline und die Verminderung der γ-Globuline im Fall 1 und 2 auf. Disk-elektrophoretisch fällt in den 3 Fällen die deutliche Vermehrung der α_1-Globulinbanden auf. Die Vermehrung der α_2-Globuline stellt sich durch die Verstärkung der Haptoglobinbanden dar (Fall 2 und 3). Im Fall 1 ist die Vermehrung der Haptoglobine vom Typ 2-2 nicht ausgeprägt, es besteht aber eine starke Hypoproteinämie (Serumeiweiß 5,34g%), die man besonders an der deutlichen Verminderung der Albuminfraktion erkennt. Beim zweiten Patienten ist das Transferrin verringert und das Haptoglobin (Typ 1-1) deutlich vermehrt. Die

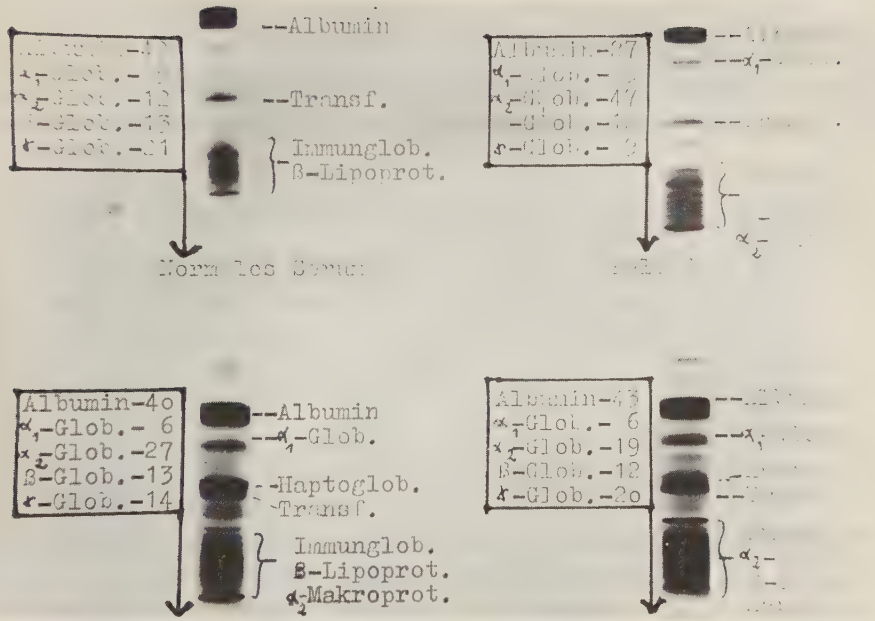


Abb.11 Disk-Elektrophorese bei 3 Patienten mit nephrotischem Syndrom (In den umrahmten Kästchen die Werte der zugehörigen Papier-Elektrophorese in rel.%)

Haptoglobinvermehrung (Hp. 2-1) beim dritten Patienten ist nur gering ausgeprägt. Die Posttransferrinfraktionen sind besonders in den Fällen 2 und 3 vermehrt und müssen als Zeichen einer Vermehrung der ß-Lipoproteide , der α_2-Globuline und des α_2-Makroglobulins aufgefaßt werden. Daß es sich um eine Vermehrung der Lipoproteide und nicht der Immunglobuline handeln muß, geht daraus hervor, daß nach immun-elektrophoretischen Untersuchungen bei Nephrosen die Immunoglobuline vermindert sind.

4. Transferrin

Bei Eisenmangelanämien ist das Transferrin stark erhöht. Diese Erhöhung läßt sich auch mit der Disk-Elektrophorese erfassen (Abb.12, Fall 1)

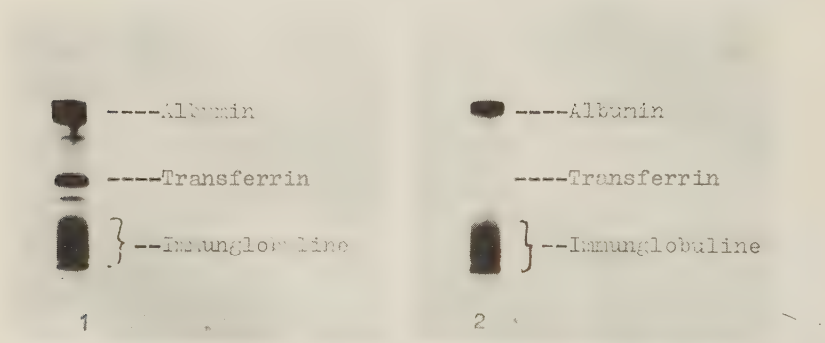


Abb.12 Disk-Elektrophorese bei unterschiedlichen Transferrinkonzentrationen (1=Eisenmangelanämie, 2=Lebercirrhose)

Bei dem ersten Patienten betrug die Eisenbindungskapazität 543 % (normal 300-350 %). Eine Verminderung des Transferrins findet man bei Lebercirrhosen, was auch in der Disk-Elektrophorese deutlich zur Darstellung kommt (Abb.12, Fall 2). Eine solche Verminderung des Transferrins konnten wir bei optischem Vergleich gegenüber Normalseren nur bei schweren Lebercirrhosen finden. Bei 32 untersuchten Patienten mit Fettleber war keine Verminderung des Transferrins zu erkennen.

5. Haptoglobine

Im Serum findet sich eine Eiweißfraktion, die Hämoglobin bindet und als Haptoglobin bezeichnet wird. Untersuchungen mit der Stärkegel-Elektrophorese haben gezeigt, daß das Haptoglobin kein einheitliches Protein darstellt, sondern aus mehreren Fraktionen bestehen kann (4). Diese Haptoglobintypen sind genetisch bedingt, wobei für die Ausbildung der Haptoglobine zwei allele Gene Hp. 1 und Hp. 2 verantwortlich sind. Auch mit der Disk-Elektrophorese lassen sich die Haptoglobintypen darstellen (s.Abb.13).

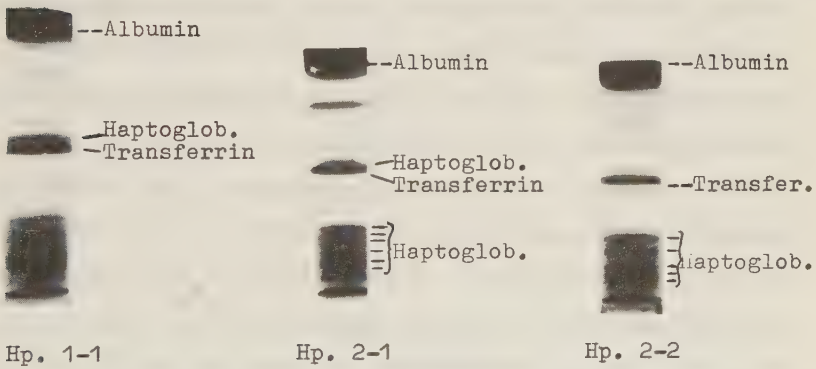


Abb.13 Darstellung der 3 Haptoglobintypen mit der Disk-Elektrophorese

Seren vom Hp. 1-1-Typ enthalten nur eine Bande vor dem Transferrin,Seren vom Typ Hp. 2-2 dagegen 5-6 Banden nach dem Transferrin. Heterogene Merkmalsträger mit beiden Genen, Typ Hp. 2-1, enthalten sowohl die Bande vor als auch die Bande nach dem Transferrin. Wir konnten von 2o3 untersuchten Seren bei Anilin-Blauschwarzfärbung 173 Seren (85%)

einem der 3 Haptoglobintypen zuordnen. 76 Seren (44,1%) entsprachen dem Hp. 2-2-Typ, 73 Seren dem Hp. 2-1-Typ (42,2%) und 24 Seren dem Hp. 1-1-Typ (13,7%). 15% der untersuchten Seren war keinem der 3 Typen sicher zuzuordnen, was möglich wäre, wenn man nicht die Anilin-Blauschwarz-, sondern die Hämoglobinfärbung durchführen würde.

D. Besprechung der Ergebnisse

Untersuchungen und Ergebnisse über die von Davis und Ornstein im Jahre 1959 (6) eingeführte Disk-Elektrophorese liegen für die Klinik nur spärlich vor (12,23). Die bisherigen Arbeiten beschränken sich auf die Anwendung dieses Verfahrens für die Reinheitsanalyse von Proteinfraktionen in der Biochemie (11,14,17) und der Charakterisierung der Haptoglobintypen bei der Anwendung im Serum (14). Einer Verbreitung der Disk-Elektrophorese in der Klinik steht sicherlich, wenn auch kleinerenteils die anfangs schwierige Methodik, die ein längeres Einarbeiten erfordert, im Wege. Der Hauptnachteil der Disk-Elektrophorese liegt aber in den besonderen Schwierigkeiten, die sich bei der Identifizierung der Proteinbanden und deren quantitativer Auswertung ergeben. So sind bis heute mit Sicherheit (5,14,16, 17,24) nur das Präalbumin, das Albumin, das Transferrin und das α_2-Makroglobulin zu identifizieren, während die anderen Proteinfraktionen im Postalbumin- und Posttransferrinbereich, wie z.B. die Haptoglobine (15), nur durch spezielle Färbemethoden eindeutig nachweisbar sind. Besonders im Posttransferrinbereich ist eine Zuordnung der Protein-

banden ungenügend, da die Auftrennung der Proteinfraktionen nach dem Startpunkt unzureichend ist und sich in diesem Bereich neben den γ-Globulinen auch die α_2- und ß-Globuline befinden. Dieser Umstand führt zur Überlagerung der Proteinfraktionen, was nicht nur die Identifizierung, sondern auch die quantitative Auswertung unmöglich macht. Was die quantitative Auswertung der disk-elektrophoretisch getrennten Proteine anbelangt, so muß man, um alle dargestellten Proteine zu erfassen , das Albumin, das im Serum die höchste Konzentration besitzt, als Bezugspunkt wählen. Stellt man aber den verwandten Flächenintegrator auf das Albumin ein, so ist das Gerät unempfindlich, um die kleinen schmalen Proteinbanden abgegrenzt nachweisen zu lassen. Diese kleinen Banden kann man nachweisen, wenn man beispielsweise das Transferrin als Bezugspunkt wählt. Man ist dann aber nicht mehr in der Lage eine sichere quantitative Aussage abzugeben, weil das Transferrin selbst Veränderungen unterliegt.

Um den Wert der Disk-Elektrophorese beurteilen zu können, ist es unerläßlich, die Ergebnisse kritisch zu betrachten und einen Vergleich zu der Papier-Elektrophorese herzustellen. Wie mit anderen Elektrophoresemethoden, so lassen sich die Paraproteine disk-elektrophoretisch einwandfrei darstellen. Es gelingt auch eine Unterscheidung in IgA, IgG und IgM, was mit der Papier-Elektrophorese nicht möglich ist. Bei allen von uns untersuchten Patienten mit IgA- und

IgG-Plasmocytomen, sowie bei der Makroglobulinämie Waldenström, war im Posttransferrinbereich eine scharf begrenzte Haupt-Paraproteinbande nachweisbar (Abb.7,8,9). Zusätzliche Nebenkomponenten, die ohne dissoziierende SH-Reagenzien darstellbar sind, können vorhanden sein. Sie liegen meistens im Posttransferrinbereich, nur bei 2 von 15 Patienten im Postalbuminbereich (Abb.8,Fall 2; Abb.9,Fall 2). Bei den IgA-Plasmocytomen lagen die Nebenkomponenten ebenso wie die Hauptkomponente immer im Posttransferrinbereich. Die Identifizierung schwächer konzentrierter Nebenkomponenten eines Paraproteins kann bei zusätzlicher Vermehrung der Haptoglobine im Posttransferrinbereich schwierig sein. In Zweifelsfällen kann der Hämoglobinzusatz oder eine Elektrophorese nach Zugabe dissoziierender SH-Reagenzien herangezogen werden (14,23). Die Abb.14 zeigt, daß bei den IgA-Paraproteinen die Hauptkomponente etwa 1,5 cm von der Auftragsstelle entfernt im Posttransferrinbereich liegt.

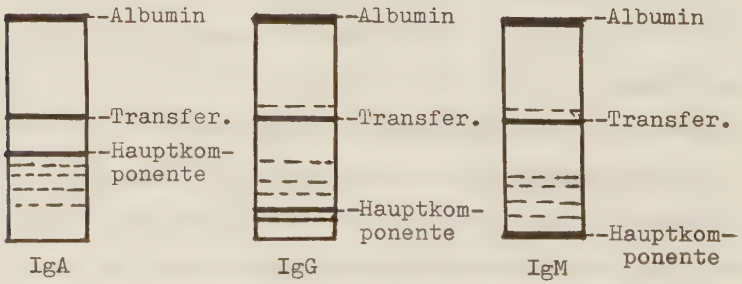


Abb.14 Lagerung von Haupt- und Nebenkomponenten bei Paraproteinämien (----- Nebenkomponenten)

Die schwächer konzentrierten Nebenkomponenten liegen, falls vorhanden, zwischen der Hauptkomponente und der Auftragsstelle, jedoch nie in Richtung Transferrin oder gar im Postalbuminbereich (Abb.7 und 14). Beim IgM-Paraprotein findet man die Hauptkomponente nahe der Auftragsstelle, die Nebenkomponenten liegen im Posttransferrinbereich oder nahe dem Transferrin (Abb.9 und 14). Das IgG-Paraprotein nimmt, wenn man die Lage der Paraproteinkomponenten vergleicht, eine Mittelstellung zwischen den IgA- und IgM-Paraproteinen ein. Entweder liegt die Hauptkomponente zwischen der Auftragsstelle und ungefähr der Hälfte der Distanz zwischen Transferrin und Auftragsstelle im Posttransferrinbereich (Abb.8 und 14) oder es sind zwei gleich stark konzentrierte Paraproteinkomponenten im Posttransferrinbereich vorhanden (Abb.8,Fall 2 und 5).Bei einem der Patienten lag eine starke Paraproteinkomponente im Postalbuminbereich unmittelbar vor dem Transferrin (Abb.8, Fall 2).

Für die Beurteilung von Dysproteinämien bringt nach unseren bisherigen Erfahrungen die Disk-Elektrophorese gegenüber der konventionellen Papier-Elektrophorese keine Vorteile. Dafür ist insbesondere die Überlagerung der α_2-, ß- und γ-Globuline im Posttransferrinbereich verantwortlich, was einen optischen Vergleich nur zuläßt, mit dem naturgemäß geringe Proteinschwankungen nicht erfaßt werden können.Die gegenüber der Papier-Elektrophorese größere Anzahl von Banden, die mit der Disk-Elektrophorese erzielt werden, wird sich erst dann für die Diagnostik verwerten lassen,

wenn die Disk-Elektrophorese quantitativ auswertbar ist und alle Banden identifizierbar sind. Daß dann auch für die Diagnostik verwertbare Ergebnisse zu erwarten sind, zeigen die unterschiedlichen Posttransferrinbanden bei den untersuchten Patienten mit Lebercirrhose (Abb.1o).
Die Haptoglobine lassen sich mit der Disk-Elektrophorese gut charakterisieren und den Typen 1-1, 2-1 und 2-2 zuordnen, was uns in 173 von 2o3 Fällen gelang. Die fehlenden 3o Fälle wären ebenfalls den Hp.-Typen zuzuordnen, wenn man statt der Anilin-Blauschwarz- eine Hämoglobin-Färbung durchführen würde.
Faßt man die bisherigen Ergebnisse über die Anwendung der Disk-Elektrophorese in der klinischen Diagnostik zusammen, so ergibt sich auch auf Grund der hier dargestellten Befunde, daß dieses Verfahren derzeit keine Vorteile gegenüber der konventionellen Papier-Elektrophorese aufweist, die erst dann zu erwarten sind, wenn die Methode quantitativ auswertbar ist und alle Banden charakterisiert sind. Einer Einführung in die Routinediagnostik steht die noch ziemlich aufwendige und zeitraubende Methodik im Wege, so daß die Disk-Elektrophorese vorläufig auf die Reinheitsanalyse von Proteinfraktionen bei der Proteinisolierung beschränkt bleibt.

E. Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wird über Ergebnisse mit der Disk-Elektrophorese von Human-Seren berichtet. Untersucht wurden 2o3 Seren von 62 Gesunden und 141 Kranken.

2. Bei exakter Einhaltung der Methodik ist die Auftrennung der Proteine und die Begrenzung der Banden gut. Die Interpretation der Befunde ist dadurch erschwert, daß derzeit noch nicht alle der 15–2o Banden identifiziert sind und sich insbesondere die Banden im Posttransferrinbereich überlagern, in dem die α_2-, ß- und γ-Globuline liegen.

3. Eine quantitative Auswertung der mit der Disk-Elektrophorese erhaltenen Banden im Serum ist bisher nicht möglich, da der verwendete Flächenintegrator die Banden von Spurenproteinen nicht erfaßt.

4. Eindeutig können mit der Disk-Elektrophorese die Paraproteine IgA, IgG und IgM identifiziert werden. Auch ohne Zusatz dissoziierender SH-Reagenzien stellen sich bei der disk-elektrophoretischen Auftrennung dieser Paraproteine neben einer Haupt- eine oder mehrere Nebenkomponenten dar.

5. Die Haptoglobine können bei 85% der untersuchten Seren einer der 3 Haptoglobintypen zugeordnet werden.

F. Literaturangaben

1. Brunner,K.W.:Therapie des Plasmocytoms. Dtsch. med. Wsch. 34, 1505 (1967)
2. Deutsch,H.F. und J.I. Morton:Dissociation of human serum Globulin. Sci. 125, 600 (1957)
3. Deutsch,H.F. und J.I. Morton:Human serum makroglobulins and dissociation units. J. Biol. Chem. 231, 1107 (1958)
4. Dittmer,A.:Plasmaeiweiß und Elektrophorese. G. Fischerverlag Jena (1965)
5. Davis,B.J.:Disc-elektrophoresis, method and application to human serum.Ann. N. Y. Acad. Scientis 121, 404 (1964)
6. Davis,B.J.; Ornstein,L.A.: A new high resolution elektrophoresis method, presented at the society for the study of blood. March 24 (1959)
7. Grabar,P. und P.Burtin:Immuno-elektrophoretische Analyse. Elivier Publishing Company (1964)
8. Jandl,J.H. and Katz,J.H.:The plasmacell cycle of Transferrin. J.clin. invest. 42, 314 (1963)
9. Jahnke,K. und W.Scholtan:Die Bluteiweißkörper in der Ultrazentrifuge. Z. ges. exp. Med. 122, 39 (1953)
10. Kohlrausch,F.(1897): Über Konzentrationsverschiebungen durch Elektrophorese im Innern von Lösungen und Lösungsgemischen. Ann. Physik und Chemie 62, 209
11. Maurer,H.R.: Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co Berlin (1968)
12. Ornstein,L.A.: Disc-elektrophoresis.I Background and theory. Ann. New York Acad. sci. 121, 321 (1964)
13. Ott,H.:Elektrophoresis in acrylamide gels. Protides of biolog. Fluids, Proc. 10th, Colloq., Bruges 303 (1962)
14. Pastewka,J.W., A.T.Ness and A.C.Peakock:Elektrophoretic patterns of normal human serum by Disc-elektrophoresis in Polyacrylamidgel. Clin. chim. Acta 14, 214 (1966)

15. Ritchie,R.F., J.G.Hartner and T.H.Bayles: Refinements of acrylamide elektrophoresis. J. Lab. Clin. Med. 68, 842 (1966)
16. Ritchie,R.F.: High resolution Acrylamidgel Elektrophoresis. J. Maine Assoc. 58, 15 (1966)
17. Raymond,S. and L.Weintraub:Acrylamide Gel as a Supporting Medium for Zone Elektrophoresis. Sci. 13o, 711 (1955)
18. Scheurlen,P.G. und F.W.Tischendorf: Untersuchungen der Dissoziation von γ-Makroglobulinen durch Cysteamin. Verh. dt. Ges. inn. Med. 68,52o (1965)
19. Scheurlen,P.G.: Untersuchungen über die heterogene Zusammensetzung von Plasmocytom-Globulinen. Z. Naturforscher 17b, 598 (1962)
2o. Scheurlen,P.G.; F.W.Tischendorf, M.M.Tischendorf und M.Baake: Untersuchungen über die Heterogenität des γA-Plasmocytomglobulins. Klin. Wochenschrift 42,935(1964)
21. Waldenström,J.: Die Makroglobulinämie. In Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde. Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer-Verlag (1965)
22. Wuhrmann,F. und H.H. Märki: Dysproteinämien und Paraproteinämien. Basel-Stuttgart, Benno Schwabe & Co (1963)
23. Zingale,S.B.; C.A.Martioli; D.H.Bohner and M.P.Bueno: Disc-elektrophoresis Study of serum Proteins from Patients with Multiple Myeloma and Makroglobulinämie. Blood 22, 152 (1966)
24. Zwiesler,O. und H.Biel: Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamid-Gel. Z. klin. Chemie 4, 58 (1966)

Herrn Dozent Dr. med. D. Klaus danke
ich für die Überlassung des Themas
und die wertvollen Hinweise bei der
Ausarbeitung.

Lebenslauf

Am 28.2.1939 wurde ich, Peter Gottschalk, als Sohn des Beamten Otto Gottschalk und seiner Ehefrau Elfriede, geborene Weidemann, in Brachwitz geboren. Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.

Von 1946 - 1954 besuchte ich die Volksschule in Kladrum und Zölkow, Kreis Parchim in Mecklenburg. Nach vierjähriger Oberschulzeit in Parchim bestand ich im Juli 1958 das Abitur. Von 1958 - 1960 absolvierte ich eine Hotelfachschule in Rostock. Nach meiner Übersiedlung in die Bundesrepublik im Jahre 1960, bestand ich nach einjähriger Schulzeit im Oktober 1961 eine Ergänzungsprüfung zum Ostzonenabitur in Stuttgart. Im Wintersemester 1962/63 begann ich das Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Dort legte ich im Oktober 1963 die naturwissenschaftliche, im März 1966 die ärztliche Vorprüfung ab. Am 7. August 1969 bestand ich das medizinische Staatsexamen.